

5

---

## Immunmarker zur Diagnostik und Therapie im Zusammenhang mit Transplantat-Reaktionen

---

10

### Beschreibung

15

Die Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle als Immunmarker zur Detektion von Transplantat-Reaktionen, ein Verfahren zur Detektion von Transplantat-Reaktionen sowie die Verwendung von Immunmarkern zur medizinischen Prophylaxe, klinischen Verlaufskontrolle, Transplantatnachbehandlung, der klinischen Diagnostik und/oder der Therapie im Zusammenhang mit Zell-, Gewebe- bzw. Organtransplantationen, wobei Transplantat-Reaktionen eine Toleranz, eine Rejektionskrise oder eine Abstoßung sein können.

25

Für eine erfolgreiche Organtransplantation ist es notwendig, dass das Spenderorgan histologisch möglichst weitgehend mit dem Empfängerorgewebe übereinstimmt. Diese Übereinstimmung wird unter anderem durch das HLA-System (Abk. für (engl.) human leucocyte antigen) bestimmt. Dabei handelt es sich um ein komplexes System von Gewe-

30 antigenen, die auf fast allen Zellen vorkommen. Dieses System spielt eine wichtige physiologische Rolle bei immunologischen Abwehrreaktionen (Erkennung von „Selbst“ und „Nichtselbst“). Vor jeder Transplantation wird deshalb

35 eine so genannte Gewebetypisierung bei Organspender und -

5 empfangen vorgenommen, um eine möglichst weitgehende HLA-Kompatibilität zu gewähren.

Aufgrund des extremen genetischen Polymorphismus existiert eine außerordentlich große Anzahl verschiedener HLA-Moleküle. Eine vollständige Übereinstimmung wird ausschließlich  
10 bei eineiigen Zwillingen beobachtet, ansonsten sind HLA-Moleküle für jeden Menschen einzigartig.

Problematisch ist jedoch, dass trotz einer weitgehenden HLA-Übereinstimmung zwischen Empfänger und Spender eine Abstoßungsreaktion gegen das transplantierte Organ nicht  
15 ausgeschlossen werden kann. Trotz dieser Schwierigkeiten stellt die Transplantation die Therapie der Wahl bei irreversiblen Organversagen dar.

Der ansteigende Bedarf an Organtransplantationen zusammen mit dem verminderten Angebot an Organen sowie die oben  
20 beschriebenen Probleme erfordern eine Optimierung der bekannten Therapien. Durch die Einführung neuer verbesserter Immunsuppressiva konnte die 1-Jahrüberlebensrate auf 90% erhöht werden. Allerdings konnten die Langzeittransplantatüberlebensraten bisher nicht  
25 zufriedenstellend verbessert werden. Trotz moderner Immunsuppressiva kommt es immer noch bei der Mehrzahl der Patienten zur Entwicklung chronischer Transplantatdysfunktionen. Klinische und subklinische akute Reaktionen, auch wenn sie zunächst erfolgreich mit einer  
30 Rejektionstherapie behandelt werden, stellen dabei den größten unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung dieser späten Transplantatverluste dar. Eine effiziente Diagnostik und/oder Therapie derartiger - vor allem

5 subklinisch verlaufender - Prozesse ist daher von großer Wichtigkeit.

Eine Induktion einer Langzeit- und vornehmlich medikamentenfreien Transplantatakzeptanz ohne Beeinträchtigung der Organ-, Gewebe- oder Zellfunktionen und der  
10 Immunkapazität des Transplantatempfängers ist daher von großer Bedeutung. Klinisch wird die Toleranz als permanentes Transplantatüberleben mit normaler Organfunktion bei Abwesenheit akuter und chronischer Abstoßungsreaktionen und dem Erhalt der antimikrobiellen  
15 Immunreaktivität definiert.

Neue Strategien zur Induktion einer Transplantattoleranz bestehen in der Applikation immunregulatorischer Proteine oder in einer Induktion eines Chimerismus. Bei den immunregulatorischen Proteinen kann es sich entweder um  
20 Antikörper handeln, die eine Depletion der donor-reaktiven T-Zellen bewirken, z.B. anti-CD3-Immunotoxin, oder um Antikörper und Proteine, die die Aktivierung der donor-reaktiven T-Zellen beeinflussen, z.B. anti-CD4-Antikörper, anti-CD40L-Antikörper oder CTLA4-Ig. Chimerismus bedeutet  
25 das parallele Vorhandensein von Blutleukozyten des Spenders und des Empfängers mit Hilfe nicht-myeloablativer Verfahren zur Transplantation von Stammzellen des Spenders.

Bisher erfolgte nach der Transplantation eine dauerhafte Kontrolle des Zustandes des Transplantates dadurch, dass  
30 die Funktion des Transplantates als Maß herangezogen wird; z.B. durch die Bestimmung des Serumkreatininspiegels im Falle eines Nierentransplantates. Außerdem werden Biopate entnommen und nach dem „Banff Score“ histologisch

5 beurteilt. Damit kann beurteilt werden, ob Veränderungen  
assoziiert mit einer akuten Abstoßung - Infiltration  
mononukleärer Zellen - oder chronische Abstoßungen  
(Vaskulopathie) nachweisbar sind.

10 Klinisch manifeste Rejektionen werden durch Funktions-  
verschlechterung der Organe definiert, wie beispielsweise  
Herzfunktion, dem Serumkreatinin in dem der Lungenfunktion  
oder anderen. Leider stehen diese Funktions-  
verschlechterungen am Ende einer Effektorkette. Eine  
frühzeitige Diagnostik bereits subklinisch ablaufender  
15 Prozesse wäre sehr hilfreich. Auch ist eine  
Funktionsverschlechterung nicht immer durch eine Rejektion  
bedingt; es gibt auch andere Ursachen wie Toxizität und  
Infektionen, die differentialdiagnostisch abgegrenzt werden  
müssen, was gegenwärtig viel Zeit beansprucht und oft sehr  
20 schwierig ist. Subklinisch verlaufende Reaktionen können  
bisher nur durch Protokollbiopsien und konventionelle  
Histologie, zumindest innerhalb gewisser Grenzen,  
verlässlich beurteilt werden. Jedoch werden dabei auch  
Infiltrate als negativ beurteilt, die möglicherweise eine  
25 protektive Wirkung auf das Transplantat haben, wie in  
Tierexperimenten gezeigt werden konnte. Für Nieren-  
transplantate wurde nachgewiesen, dass molekularbiologische  
Untersuchungen im Urin eine klinisch manifeste Rejektion  
reflektieren können, aber es fehlen Untersuchungen zum  
30 subklinischen Bereich der Rejektionen. Es besteht also ein  
großer Bedarf an Markern für das Monitoring von  
Transplantaten (Biopate, Urin, Lavage, Blut etc), um  
unerwünschte Immunreaktionen gegen das Transplantat

5 rechtzeitig - d.h. möglichst vor der Organschädigung, - und  
differentialdiagnostisch sicher - als Abgrenzung gegen  
andere Prozesse, die die Organfunktion beeinträchtigen - zu  
erfassen.

Aufgrund der Nebenwirkungen der chronischen Applikation der  
10 derzeit üblichen Mehrfachimmunsuppressivaschemata wird  
immer wieder versucht, bei gut gehender Funktion einzelne  
oder mehrere der immunsuppressiven Komponenten abzusetzen -  
nachteilhafterweise ist dieser Ansatz immer durch das  
Auftreten von akzelerierten Abstoßungsprozessen, manchmal  
15 erst Jahre nach Absetzen, gefährdet. Es fehlt völlig an  
Parametern, die ein derartiges Vorgehen verlässlich  
individuell optimieren könnten. Eine Verbesserung der  
bisherigen Strategien durch Einführung toleranzinduzierter  
Protokolle würde die Therapie durch weniger Nebenwirkungen  
20 und weniger Kosten revolutionieren. Die Übertragung der  
oben erwähnten toleranzinduzierenden Therapien auf den  
Menschen birgt jedoch etliche Gefahren, da nach Absetzen  
der Toleranzinduktionstherapie rechtzeitig Therapieversager  
identifiziert werden müssen, um eine irreversible  
25 Schädigung des Transplantates durch Rejektion zu  
verhindern. Selbst in Tiermodellen werden niemals 100% der  
Empfänger tolerant.

Nachteilhaft bei den bisherigen Methoden ist es, dass keine  
Entscheidungen über das sichere Absetzen einer  
30 immunsuppressiven Therapie getroffen werden können, ohne  
dabei das Auftreten von Rejektionskrisen zu riskieren.

Ein weiterer Nachteil ist, dass die bekannten Methoden es  
nicht ermöglichen, während oder nach der Behandlung, auch

5 nach konventionellen Therapien, bevor eine Transplantats-  
funktionsverschlechterung auftritt, eine Vorhersage von  
Rejektionskrisen zu ermöglichen. Die bisher zur Verfügung  
stehenden diagnostischen Mittel und Methoden sind nur  
begrenzt zur Beurteilung einer toleranzinduzierenden  
10 Therapie einsetzbar. Die Beurteilung der Therapie  
hinsichtlich der Funktion des Transplantates - z.B. des  
Serumkreatinins - kommt zu spät, da es bei einem  
nachweisbaren Anstieg des Serumkreatinins schon zu einer  
Schädigung des transplantierten Organs, beispielsweise der  
15 Niere, gekommen ist. Hinsichtlich der toleranzinduzierenden  
Therapien bedeutet ein signifikanter Anstieg des  
Serumkreatinins ein Fehlschlagen der Therapie und für den  
Patienten wahrscheinlich das Umsteigen auf konventionelle  
Immunsuppressiva mit den bekannten Nebenwirkungen. Auch die  
20 bekannte Analyse einer Biopsie ist in diesem Fall nur  
bedingt hilfreich, da viele toleranzinduzierenden  
Therapien, wie z.B. mit anti-CD4-Antikörpern nur bedingt  
die Infiltration mononukleärer Zellen in das Transplantat  
verhindern. Innerhalb der bisherigen Methoden und Verfahren  
würde dies als akute Abstoßungs- bzw. Rejektionskrise  
25 betrachtet werden, und der Patient würde mit hochdosierten  
konventionellen Immunsuppressiva behandelt werden. Eine  
hochdosierte Gabe konventioneller Immunsuppressiva kann  
sich jedoch zusätzlich negativ auf den Erfolg der toleranz-  
induzierten Therapie auswirken, was ebenfalls ein  
30 Fehlschlagen der Therapie bedeuten würde. Aber auch für die  
konventionellen Immunsuppressionen wären verbesserte  
diagnostische Mittel und Methoden hinsichtlich der  
Früherkennung klinischer und subklinischer akuter

5 Abstoßungskrisen und beginnender chronischer Rejektions-  
prozesse hilfreich. Dies würde es unter anderem  
ermöglichen, die Therapie zu variieren bevor eine  
nachweisbare Schädigung des Transplantates - z.B. Anstieg  
des Serumkreatinins - vorliegt. Außerdem kann eine  
10 Verschlechterung der Organfunktion auch durch Nebenwirkung  
einer hochdosierten immunsuppressiven Therapie oder durch  
Infektionen im Transplantat hervorgerufen werden, was durch  
bekannte Methoden ebenfalls nicht detektiert werden kann.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, effiziente und zu-  
15 verlässige Immunmarker bereitzustellen, welche eine sichere  
und schnelle Vorhersagbarkeit des Risikos einer  
Transplantatabstoßung bzw. des Fehlen selbiger - als Form  
einer Toleranz - in medizinischer Prophylaxe, klinischer  
Verlaufskontrolle oder der Transplantatnachbehandlung  
20 ermöglichen.

Die vorliegende Erfindung löst dieses technische Problem  
durch die Bereitstellung eines isolierten Nucleinsäure-  
moleküls ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

- 25 a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz  
ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1 -  
8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen,
- b) ein Nucleinsäuremolekül, welches mit einer  
Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen  
hybridisiert,
- 30 c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine  
Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie

5 aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,

d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetischen Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und

10 e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist.

15 Es war überraschend, dass die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle mit Entzündungen, insbesondere chronischen Entzündungen, Autoimmunerkrankungen, Läsionen, allgemeinen Wunden und Transplantat-Reaktionen, insbesondere mit Transplantatrejektionen oder anderen  
20 Transplantatdysfunktionen sowie dem Ausbleiben dieser - als Form der Transplantattoleranz - assoziiert sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Nucleinsäuremolekül, das eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz ausgewählt aus der  
25 Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1-8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen funktionsanalog zu sein, zumindest zu 40% homolog. Im Sinne der Erfindung heißt, um zu den genannten Nucleotidsequenzen bzw. den mit diesen Nucleotidsequenzen hybridisierenden Sequenzen funktions-  
30 analog zu sein, dass die Homologen bei Transplantat-Reaktionen ein Verhalten zeigen, das Rückschlüsse auf das



5 Transplantat und dessen Verhältnis zum Empfängerorganismus zulässt.

Funktionsanaloge Sequenzen sind im Sinne der Erfindung all jene Sequenzen, die der Fachmann als gleichwirkend identifizieren kann. Beispielsweise ist es möglich, dass  
10 der Fachmann in verschiedenen Versuchstieren, wie z.B. der Ratte oder dem Kaninchen, erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle identifiziert und so aufgrund von Homologie-Untersuchungen in der Lage ist, funktionsanaloge Strukturen in anderen Organismen, wie beispielsweise Schimpansen oder  
15 Hunden, zu identifizieren. Selbstverständlich ist es auch möglich, dass der Fachmann aufgrund seiner Kenntnis der in der Maus oder Ratte gefundenen Nucleinsäuremoleküle auch in humanen Patienten Analoge und Homologe aufgrund von Homologie- oder Analogie-Untersuchungen detektiert.  
20 Weiterhin ist es möglich, dass der Fachmann im humanen Bereich isolierte erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle in spezifischen Versuchstieren detektiert, mit denen bestimmte Transplantationsreaktionen untersucht werden können, wie beispielsweise in Schweinen oder auch in wirbellosen  
25 Organismen, wie z.B. Nematoden bzw. anderen Organismen, die für spezifische Fragestellungen der Transplantationsbiologie herangezogen werden können.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung weist das Nucleinsäuremolekül mindestens 60%,  
30 vorzugsweise 70%, bevorzugt 80%, ganz besonders bevorzugt 90% Homologie zu einem Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1-8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen

5 auf, wobei dieses Nucleinsäuremolekül eine biologische Aktivität wie die unter SEQ ID Nr. 1-8 aufgezeigten Sequenzen oder deren komplementären Sequenzen aufweist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Nucleinsäuremolekül eine genomische DNA, eine cDNA  
10 und/oder eine RNA. Besonders bevorzugt ist das Nucleinsäuremolekül eine mRNA.

Die Erfindung betrifft auch einen Vektor, der ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül umfasst. Weiterhin betrifft die Erfindung auch eine Wirtszelle, die den Vektor  
15 im erfindungsgemäßen Vektor umfasst. Die Erfindung betrifft auch ein Polypeptid, was durch ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül kodiert wird.

Die Erfindung betrifft auch ein Erkennungsmolekül, das gegen das Nucleinsäuremolekül, den Vektor, die Wirtszelle  
20 und/oder das Polypeptid gerichtet ist. Erkennungssubstanzen im Sinne der Erfindung sind Moleküle, die mit den genannten Strukturen wie Nucleinsäuremolekülen oder -sequenzen, Vektoren, Wirtszellen und/oder Polypeptiden bzw. deren Fragmenten wechselwirken können; insbesondere so  
25 wechselwirken, dass eine Detektion dieser Strukturen möglich ist. Die Erkennungssubstanzen können insbesondere spezifische Nucleinsäuren sein, die mit den genannten Nucleinsäuremolekülen binden, aber auch Antikörper, Fluoreszenzmarker, markierte Kohlenhydrate oder Lipide,  
30 Antisense-Konstrukte, cDNA oder mRNA-Moleküle bzw. deren Fragmente. Es ist selbstverständlich auch möglich, dass die Erkennungssubstanzen nicht Proteine oder Nucleinsäuren bzw. Antikörper sind, sondern gegen diese gerichtete Antikörper.

5 Die Erkennungssubstanzen können in solch einem Fall insbesondere sekundäre Antikörper sein.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung sind die Erkennungsmoleküle ein Antikörper, ein Antikörperfragment und/oder ein Antisensekonstrukt, insbesondere ein RNA-  
10 Interferenzmolekül.

Die Autoantikörper im Sinne der Erfindung binden die erfindungsgemäßen Polypeptide spezifisch. Die Antikörper können auch modifizierte Antikörper sein (z.B. oligomere, reduzierte, oxidierte und markierte Antikörper). Der in der  
15 vorliegenden Beschreibung verwendete Begriff Antikörper umfasst sowohl intakte Moleküle als auch Autoantikörper-Fragmente, wie Fab, F(ab')<sub>2</sub> und Fv, die bestimmte Epitop-Determinanten der Polypeptide binden können. Bei diesen Fragmenten ist die Fähigkeit des Antikörpers zur selektiven  
20 Bindung seines Antigens oder Rezeptors teilweise erhalten geblieben, wobei die Fragmente wie folgt definiert sind:

(1) Fab, das Fragment, das ein monovalentes Antigenbindungsfragment eines Antikörper-Moleküls enthält, lässt sich mittels Spaltung eines ganzen Antikörpers mit dem  
25 Enzym Papain erzeugen, wobei eine intakte leichte Kette und ein Teil einer schweren Kette erhalten werden;

(2) das Fab'-Fragment eines Antikörper-Moleküls lässt sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit Pepsin und anschließender Reduktion gewinnen, wobei eine  
30 intakte leichte Kette und ein Teil der schweren Kette

5 erhalten werden; pro Antikörper-Molekül werden zwei Fab'-Fragmente erhalten;

(3)  $F(ab')_2$ , das Fragment des Antikörpers, das sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit dem Enzym Pepsin ohne anschließende Reduktion erhalten lässt;  $F(ab')_2$  ist eine Dimer von zwei Fab'-Fragmenten, die durch zwei Disulfid-Bindungen zusammengehalten werden;

10 (4)  $F_v$ , definiert als gentechnisch verändertes Fragment, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette enthält und in Form von zwei Ketten exprimiert wird; und

15 (5) Einzelketten-Antikörper („SCA“), definiert als gentechnisch verändertes Molekül, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette enthält, die durch einen geeigneten Polypeptid-Linker zu einem genetisch fusionierten Einzelketten-Molekül verbunden sind.

Der in der vorliegenden Erfindung verwendete Begriff Epitop bedeutet eine beliebige Antigen-Determinante auf dem Polypeptid. Epitop-Determinanten bestehen normalerweise aus chemisch aktiven Oberflächen-Gruppierungen von Molekülen, wie Aminosäuren oder Zucker-Seitenketten, und besitzen normalerweise sowohl spezifische Merkmale der dreidimensionalen Struktur als auch spezifische Ladungsmerkmale.

30 Die Erfindung betrifft auch Vakzine, die das Nucleinsäuremolekül, den Vektor, die Wirtszelle, das

5 Polypeptid und/oder das Erkennungsmolekül gegebenenfalls mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfassen. Bei dem pharmazeutisch akzeptablen Träger handelt es sich um an sich bekannte pharmazeutische Hilfs- und/oder Zusatzstoffe. Bei diesen, dem Fachmann an sich bekannten Zusatz- und  
10 Trägerstoffen, kann es sich auch um Liposomen bzw. um in der Gentechnik bekannte Strukturen bzw. Lösungen und/oder Puffergemische oder um andere Substanzen aus dem Bereich der Galenik handeln.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Detektion von  
15 Transplantat-Reaktionen in einer Probe von einem Patienten, wobei in der Probe ein Level von mindestens einem Nucleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

- 20 a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1 - 8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen,
- b) ein Nucleinsäuremolekül, welches mit einer Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,
- 25 c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalbg zu sein,
- d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetisches Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert  
30 ist und

5 e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist

10 bestimmt und der Level mit einem Kontroll-Level einer Vergleichsprobe von einem gesunden Patienten verglichen wird, wobei durch einen modifizierten Level in der Probe im Vergleich zu dem Kontroll-Level die Transplantat-Reaktionen - was auch das Fehlen selbiger als Toleranz einschließt -  
15 detektiert wird.

Als Transplantat-Reaktion im Sinne der Erfindung wird demgemäß jede physiologische und pathophysiologische Wechselwirkung des Transplantates mit dem Empfängerorganismus aber auch jede isolierte Reaktion innerhalb des  
20 Transplantates verstanden. Die Transplantat-Reaktion kann daher im Sinne der Erfindung eine Toleranz sein bzw. eine Abstoßung des Transplantates. Demgemäß ist eine Transplantat-Reaktion im Sinne der Erfindung auch ein nicht pathologischer, d.h. ein normaler oder gesunder, Zustand,  
25 in dem sich das Transplantat selbst und in Bezug auf den Empfängerorganismus befinden kann. Eine Probe im Sinne der Erfindung ist die Bezeichnung für ein durch Probenentnahme entnommenes biologisches Gut oder eines Teiles bzw. einer kleinen Menge eines solchen, dessen Beschaffenheit  
30 chemisch, biologisch, klinisch oder ähnlich geprüft werden soll. Die Probenentnahme aus dem Patienten bzw. aus gewonnenen humoralen oder zellulären Bestandteilen des Patienten erfolgt insbesondere so, dass die entnommene

5 Teilmenge einem Durchschnitt der gesamten Menge entspricht.  
Die durch Untersuchung der Probe ermittelten Merkmale  
dienen der Beurteilung der durch die Probe erfassten Menge,  
die Rückschlüsse auf die Gesamtmenge, z.B. ein gesamtes  
10 transplantiertes Organ, wie Leber, Milz, Blut oder aber auch  
von nicht transplantierten Bestandteilen, wie z.B. dem  
Immunsystem, zulässt. Für die Untersuchung können die  
Proben durch Mischen, Zerteilen, Zerkleinern, Zugabe von  
Enzymen oder Markern bzw. anders vorbehandelt werden. Dem  
15 Fachmann sind verschiedene Möglichkeiten der Vorbehandlung  
der Proben bekannt. Selbstverständlich kann es auch  
vorgesehen sein, dass die Probe so entnommen wird, dass sie  
keinem Durchschnitt der gesamten Menge entspricht. Eine  
Probe können alle biologischen und nichtbiologischen  
Materialien sein, wie biologische Gewebe und Flüssigkeiten,  
20 wie beispielsweise Blut, Lymphe, Urin, Gehirnflüssigkeit  
und andere.

Ein Transplantat im Sinne der Erfindung ist ein transplan-  
tiertes oder zu transplantierendes Organ, Gewebe oder eine  
Zelle bzw. eine Zellansammlung. Im Sinne der Erfindung  
25 können Transplantate jedoch auch bestimmte Implantate sein,  
die aus Stoffen bzw. Teilen bestehen, die zur Erfüllung  
bestimmter Ersatzfunktionen für einen begrenzten Zeitraum  
oder auf Lebenszeit in einen Körper eingebracht werden. Die  
Implantate können beispielsweise aus anorganischer Materie  
30 bestehen, die mit organischen Substanzen, wie  
beispielsweise Knorpel oder Knochenzellen, beschichtet ist.

Unter einer Transplantatabstoßung gemäß der Erfindung ist  
die Induktion einer Immunreaktion des Empfängers auf das

5 Transplantat zu verstehen, wobei eine Immunreaktion des Empfängers eine spezifische Schutz- oder Abwehrreaktion des Körpers gegen die Antigene bzw. andere Strukturen des Transplantates ist.

Ein Patient im Sinne der Erfindung ist jeder Organismus,  
10 der ein Transplantat umfasst, insbesondere ein humaner Organismus. Ein gesunder Patient im Sinne der Erfindung ist ein Patient, dessen Zustand es erlaubt, als Referenz für das vorliegende Verfahren verwendet zu werden. Gesund im Sinne der Erfindung muss nicht die völlige Abwesenheit von  
15 Krankheiten, Transplantaten oder pathogenen Veränderungen bedeuten. Der gesunde Patient stellt entweder einen einzelnen Patienten oder eine Durchschnittsmenge von Patienten dar, die als Vergleichsgruppe dergestalt dienen können, dass eine Veränderung des Levels der genannten  
20 Nucleinsäuremoleküle oder der Strukturen, für die sie kodieren bzw. den Erkennungssubstanzen bestimmt werden kann. Eine Modifikation des Levels im Vergleich zum Kontrolllevel heißt, dass die genannten Nucleinsäuremoleküle bzw. die oben genannten Immunmarker, wie  
25 insbesondere die Peptide oder die Erkennungssubstanzen, in ihrer Konzentration oder Aktivität als Protein, als Nucleinsäuremolekül oder als Antikörper detektierbare Veränderungen gegenüber dem Kontroll-Level aufweisen.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist das  
30 Transplantat ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Lunge, Milz, Herz, Leber, Pankreas und/oder von Geweben, insbesondere Inseln, Aorten, Knorpeln. Selbstverständlich ist es möglich, dass die jeweils aufgezeigten Organe bzw.



5 Gewebestrukturen allein oder in Kombination transplantiert werden können.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird der Level als eine DNA-, eine RNA-Konzentration, eine Genexpression, eine Kopienanzahl einer Nucleinsäure, eine  
10 Peptidkonzentration, eine Peptidaktivität und/oder als eine Konzentration von Isoformen bestimmt. Mit Vorteil kann der Fachmann verschiedene Möglichkeiten wählen, um den Level von mindestens einem Nucleinsäuremolekül zu bestimmen. Eine Möglichkeit ist beispielsweise die Bestimmung der  
15 Peptidkonzentration, die durch das Nucleinsäuremolekül kodiert werden, mit spektrografischen Methoden. Es ist jedoch auch möglich, den Level auf der RNA- bzw. DNA-, insbesondere mRNA- und/oder cDNA-Ebene zu bestimmen oder beispielsweise über die Aktivität der durch sie kodierten  
20 Proteine und/oder Peptide bzw. deren Fragmente. Es ist selbstverständlich möglich, dass der Level nur in dem Transplantat oder in Teilstücken desselben innerhalb oder außerhalb des Körpers bestimmt wird bzw. dass er in dem umgebenden Gewebe bzw. Körperflüssigkeiten bzw. in  
25 Biopsiematerialien oder in Flüssigkeiten, wie beispielsweise Uria, Lymphe oder Blut, detektiert wird.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird der Level als eine mRNA-Konzentration bestimmt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung  
30 ist die Transplantatreaktion eine Rejektionskrise, eine Abstoßungsreaktion, ein Abstoßungsverlauf, eine Toleranzreaktion und/oder ein Toleranzverlauf, der durch das erfindungsgemäße Verfahren detektiert wird. Der

5 Abstoßungsverlauf und die Abstoßungsreaktion können  
beispielsweise klinisch bzw. subklinisch verlaufen. Eine  
Toleranz im Sinne der Erfindung ist beispielsweise eine  
lang anhaltende normale Funktion des transplantierten  
Organs ohne Serumkreatininanstieg bzw. Proteinurie über  
10 mehr als 100, bevorzugt 200, ganz besonders bevorzugt 300  
Tage.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung  
wird durch einen verminderten Level eines  
Nucleinsäuremoleküls umfassend eine Nucleotidsequenz  
15 ausgewählt aus der Gruppe umfassend

- a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz  
ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 3  
und SEQ ID Nr. 7 oder deren komplementären  
Nucleotidsequenzen,
- 20 b) ein Nucleinsäuremolekül, welches mit einer  
Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen  
hybridisiert,
- c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine  
Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie  
25 aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b)  
funktionsanalog zu sein,
- d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetisches  
Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c)  
degeneriert ist und
- 30 e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz  
nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen,

5           Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder  
Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer  
Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist

die Abstoßungsreaktion, der Abstoßungsverlauf und/oder die  
Rejektionskrise detektiert. Ein Abstoßungsverlauf kann  
10           beispielsweise der Verlauf einer Abstoßungsreaktion mit  
bzw. ohne Medikamentengabe sein, wobei diese Medikamente  
beispielsweise immunsuppressierende Substanzen sein können.  
Mit Vorteil kann durch den verminderten Level der  
Nucleotidsequenzen bzw. deren komplementären  
15           Nucleotidsequenzen bzw. Nucleinsäuremolekülen, welche mit  
diesen Nucleotidsequenzen unter stringenten Bedingungen  
hybridisieren oder Nucleotidsäuremoleküle, die eine  
ausreichende Homologie aufweisen, um zu den genannten  
Nucleotidsequenzen funktionsanalog zu sein, bestimmt  
20           werden, ob das Transplantat selbst oder in Bezug auf den  
Empfängerorganismus zu unphysiologischen bzw.  
pathologischen Prozessen neigt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung  
wird durch einen erhöhten Level eines Nucleinsäuremoleküls  
25           umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe  
umfassend

a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz  
ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1  
und SEQ ID Nr. 2 oder deren komplementären  
30           Nucleotidsequenzen,

- 5        b) ein Nucleinsäuremolekül welches mit einer Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,
- c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie
- 10       aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,
- d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetischen Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und
- 15       e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist
- 20       die Abstoßungsreaktion, der Abstoßungsverlauf und/oder die Rejektionskrise detektiert. Im Sinne der Erfindung gehören zu den genannten Nucleinsäuremolekülen insbesondere die Nucleinsäuremoleküle, die unter stringenten Bedingungen mit den genannten Nucleinsäuremolekülen hybridisieren als auch
- 25       solche Nucleinsäuremolekülen, die eine ausreichende Homologie aufweisen, um zu den genannten Nucleinsäuremolekülen funktionsanalog zu sein sowie solche, die infolge des genetischen Codes degeneriert sind bzw. durch Deletionen, Additionen, Substitutionen,
- 30       Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu der genannten Nucleotidsequenz der Nucleinsäuremoleküle sind.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird durch einen erhöhten Level eines Nucleinsäuremoleküls ausgewählt aus der Gruppe umfassend

- 10 a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5, SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 7 und SEQ ID Nr. 8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen,
- 15 b) ein Nucleinsäuremolekül welches mit einer Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,
- c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,
- 20 d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetisches Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und
- 25 e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist

die Toleranzreaktion oder der Toleranzverlauf detektiert. Mit Vorteil ist es also möglich, durch die Detektion eines erhöhten Levels der genannten Nucleinsäuremoleküle zu bestimmen, ob das transplantierte Organ, das

30

5 transplantierte Gewebe bzw. die einzelne Zelle von dem Empfängerorganismus in einer Art und Weise akzeptiert wird, dass pathologische Reaktionen weitestgehend ausbleiben.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Nucleinsäuremoleküls, des Vektors, der Wirtszelle, des  
10 Polypeptids, des Erkennungsmoleküls und/oder der Vakzine in der medizinischen Prophylaxe, der klinischen Verlaufskontrolle, der Transplantatnachbehandlung, der klinischen Diagnostik und/oder der Therapie. Der Fachmann kann die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle bzw.  
15 Vektoren, Wirtszellen, Polypeptide, Erkennungsmoleküle und/oder Vakzine im Bereich der Prophylaxe, Verlaufskontrolle, Diagnostik oder Therapie einsetzen. Beispielsweise ist es möglich, die biologischen Strukturen, die bei einer Abstoßungsreaktion bzw. einer Reaktionskrise  
20 in ihrem Level erhöht sind, in Form einer Therapie zu erniedrigen, um somit eine Toleranz bzw. Bedingungen für eine nachfolgende Toleranz des Transplantates zu ermöglichen, zu indizieren bzw. zu unterstützen. Dies kann beispielsweise durch die Gabe von Antisense-Konstrukten  
25 bzw. RNA-Molekülen erfolgen, die in der Lage sind, eine RNA-Interferenz zu erzeugen. Es ist jedoch auch möglich, die durch die Nucleinsäuremoleküle kodierten Peptide bzw. Proteine, deren Level auch erhöht sein kann, durch Antikörper funktional so zu beeinträchtigen, dass ein  
30 physiologischer Zustand im Transplantat bzw. zwischen Transplantat und Empfängerorganismus indiziert, erreicht oder unterstützt werden kann. Selbstverständlich ist es auch möglich, einen verminderten Level von

5 Nucleinsäuremolekülen in Form einer therapeutischen  
Maßnahme zu erhöhen, wenn ein verminderter Level mit einer  
Abstoßungsreaktion bzw. einer Rejektionskrise assoziiert  
ist. Dem Fachmann sind verschiedene Möglichkeiten bekannt,  
den Level der genannten Substanzen oder Moleküle zu  
10 modifizieren, im vorliegenden Fall insbesondere zu erhöhen.  
Eine Erhöhung eines Proteinlevels ist beispielsweise  
dadurch möglich, dass der Nucleinsäure, die das  
entsprechende Protein kodiert, die natürlich im Organismus  
oder Transplantat vorliegen kann bzw. in das  
15 transplantierte Organ eingebracht wird, ein zusätzlicher  
Promoter vorgeschaltet bzw. der ursprüngliche Promoter in  
seiner Aktivität verstärkt wird. Weiterhin ist es möglich,  
die Kopienanzahl der Nucleinsäuren im entsprechenden  
Zielgewebe zu erhöhen, wodurch mehr Nucleinsäuremoleküle  
20 bereitgestellt werden und mehr Proteine exprimiert werden  
können. Dem Fachmann ist bekannt, dass derartige Maßnahmen  
nicht nur innerhalb der Therapie sondern auch in einem  
Protokoll zur Prophylaxe bzw. das zur Transplantat-  
nachbehandlung durchgeführt werden können. Klinische  
25 Verlaufskontrollen bzw. diagnostische Maßnahmen können mit  
Vorteil so erfolgen, dass im Verlauf von bestimmten, durch  
den Fachmann festzulegenden Zeitabständen im Urin bzw.  
Biopsiematerial eine Quantifizierung der Expression der  
Nucleinsäuremoleküle bzw. der sie kodierenden Peptide oder  
30 Fragmente erfolgt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung  
werden die Nucleinsäuremoleküle und ihre Homologe bzw. die  
modifizierten Nucleinsäuremoleküle zur Detektion von T-

5 Zell-vermittelten Immunprozessen, insbesondere von pathogenen T-Zell-vermittelten Immunprozessen verwendet. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle und auch ihre Abkömmlinge, ihre komplementären Strukturen sowie die Peptide, die sie kodieren, können beispielsweise genutzt  
10 werden, um Komplementreaktionen bzw. andere Prozesse zu detektieren, bei denen T-Zellen eine gewisse Bedeutung haben. Insbesondere können pathogene T-zell-vermittelte Immunprozesse wie z.B. Diabetes mellitus Typ I, rheumatoide Arthritis, chronische Darmentzündung, Dermatosen und/oder  
15 Allergien detektiert werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden als T-Zell-vermittelte Immunprozesse Autoimmunerkrankungen oder Entzündungen detektiert, insbesondere eine antiglomeruläre Basalmembrankrankheit,  
20 Autoimmunkrankheiten des Nervensystems, ein systemischer Lupus erythematodes, eine Addison-Krankheit, ein Antiphospholipid-Syndrom, eine IgA-Glomerulonephritis, ein Goodpasture-Syndrom, ein Lambert-Eaton-Myasthenie-Syndrom, ein bullöses Pemphigoid, eine thrombozytopenische,  
25 idiopathische Purpura, eine Autoimmun-Thyreoiditis, eine rheumatoide Arthritis, ein insulinabhängiger Diabetes mellitus, ein Pemphigus, eine autoimmunhämolytische Anämie, ein Dermatitis herpetiformis Duhring, eine membranöse Glomerulonephritis, eine Graves-Krankheit, eine  
30 sympathische Ophthalmie, Autoimmun-Polyendokrinopathien, multiple Sklerose und/oder Reiter-Krankheit.



5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die T-Zell-vermittelten Immunprozesse physiologische, pathologische und/oder klinische Transplantat-Reaktionen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die Transplantat-Reaktionen eine Rejektionskrise, eine  
10 Abstoßungsreaktion, ein Abstoßungsverlauf, eine Toleranzreaktion und/oder ein Toleranzverlauf.

Die Erfindung betrifft auch einen Kit, der das Nucleinsäuremolekül, den Vektor, die Wirtszelle, das Polypeptid, das Erkennungsmolekül und/oder die Vakzine  
15 umfasst, sowie die Verwendung des Kits zur Detektion der Transplantatreaktion.

Die Erfindung weist mehrere Vorteile auf. So ist es insbesondere möglich, nach Transplantationen eine dauerhafte Kontrolle des Zustandes des Transplantates  
20 durchzuführen, wobei es möglich ist, die als Marker verwendeten erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Peptide bzw. Erkennungssubstanzen aus verschiedenen Proben des Patienten, beispielsweise Urin, zu gewinnen. Somit ist es insbesondere möglich, frühzeitig Funktionsver-  
25 schlechterungen des Transplantates, sozusagen am Beginn der Effektorkette, festzustellen. Durch die erfindungsgemäßen Substanzen und das erfindungsgemäße Verfahren ist es also möglich, bereits subklinisch ablaufende Prozesse frühzeitig zu diagnostizieren. Somit müssen subklinisch verlaufende  
30 Reaktionen nicht mehr mit Kontrollbiopsien und konventioneller Histologie bestimmt werden. Weiterhin können die genannten Substanzen als Marker für das Monitoring von Transplantaten benutzt werden, um

5 unerwünschte Immunreaktionen vor der Organschädigung und  
differentialdiagnostisch sicher zu erfassen. Das Monitoring  
kann beispielsweise als Verlaufskontrolle bei Mehrfach-  
immunsuppressivaschemata verwandt werden, wobei gutgehende  
Funktionen einzelne oder mehrere der immunsuppressiven  
10 Komponenten abgesetzt werden können, wobei das Auftreten  
von akzelerierten Abstoßungsprozessen frühzeitig erkannt  
werden kann. Das Verfahren lässt sich dadurch auch  
individuell von Patient zu Patient optimieren. Auch ist es  
durch die Marker mit Vorteil möglich, toleranzinduzierte  
15 Protokolle und toleranzinduzierende Therapien auf den  
Menschen zu übertragen, da nach Absetzen der  
Toleranzinduktionstherapie rechtzeitig Therapieversager  
identifiziert werden können, um eine irreversible  
Schädigung des Transplantates zu verhindern. Das heißt, die  
20 erfindungsgemäßen Substanzen, das erfindungsgemäße  
Verfahren und die Verwendungen stellen exakte  
Analysemethoden zur Verfügung, um die Induktion, den Erfolg  
und die Erhaltung einer Toleranz zu beurteilen. Mit dem  
erfindungsgemäßen Verfahren kann unter anderem auch das  
25 Zusammenbrechen der Toleranz, beispielsweise durch  
Vorliegen einer Infektion, vorhergesagt werden. Es ist  
daher möglich, Entscheidungen über das sichere Absetzen  
einer immunsuppressiven Therapie zu treffen, ohne dass  
vorteilhafterweise das Auftreten von Reaktionskrisen  
30 riskiert werden muss. Eine wichtige Anwendung der  
erfindungsgemäßen Nucleinsäure des erfindungsgemäßen  
Verfahrens ist daher die Vorhersage von Reaktionskrisen  
während oder nach der Behandlung, auch nach konventionellen  
Therapien, bevor eine Transplantatfunktionsverschlechterung

5        auftritt. Weiterhin wird aber auch die konventionelle  
Immunsuppression durch die erfindungsgemäßen  
Nucleinsäuremoleküle und das erfindungsgemäße Verfahren  
hinsichtlich der Früherkennung klinischer und subklinischer  
akuter Abstoßungskrisen und beginnender chronischer  
10        Reaktionsprozesse verbessert. Es ist durch die Erfindung  
möglich, die Therapie zu variieren, bevor eine nachweisbare  
Schädigung des Transplantates vorliegt. Weiterhin ist es  
möglich, die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle und die  
durch sie kodierten Proteine bzw. Proteinfragmente zum  
15        Screening von Arzneimitteln zu verwenden, die bei der  
Diagnose und Therapie von Transplantat-Reaktionen  
eingesetzt werden können.

Die Erfindung soll im Folgenden anhand von  
Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne sie  
20        darauf einzuschränken.

## Beispiele

### Beispiel 1

25        Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können in  
Labortieren identifiziert werden, so beispielsweise in dem  
anerkannten orthotropen Nierentransplantationsmodell: der  
Ratte, bei dem die Expression der erfindungsgemäßen Marker  
zur postoperativen Diagnostik verwendet werden kann. In dem  
30        verwendeten Transplantationsmodell (WF Spendernieren nach  
BDIX Rezipienten) kann durch mehrmalige Applikation eines  
anti-CD4-Antikörpers RIB5/2 eine Toleranz gegenüber  
Nierentransplantaten induziert werden, die im

5       Kontrollantikörper behandelter Empfängertiere zwischen Tag  
5 und 9 abgestoßen werden. Die Toleranz zeichnet sich durch  
eine lang anhaltende normale Nierenfunktion ohne  
Serumkreatininanstieg bzw. Proteinurie über mehr als  
300 Tage aus. Die Infiltration donor-reaktiver T-Zellen ist  
10       nur zu 50% herabgesetzt, jedoch kommt es nicht zur  
Zerstörung des transplantierten Organs.

Im Rahmen der Erfindung wurden von mit Kontrollantikörpern  
bzw. RIB/2 behandelten Empfängertieren die in das  
Transplantat eingewanderten mononukleären Zellen am Tag 5  
15       nach der Transplantation durch Kollagenaseverdau und  
Ficollgradient isoliert und deren mRNA Expression mit Hilfe  
der „PCR-Select“ Methode verglichen. Dies führte zur  
Isolierung von cDNA Fragmenten, die verstärkt in  
Transplantaten rejizierender Empfängertiere exprimiert  
20       werden: 2A5 und 2A15 (entspricht SEQ ID Nr. 1 und 2).  
Ebenso konnten cDNA Fragmente isoliert werden, deren  
Expression in Transplantaten toleranzentwickelnder  
Empfängertiere erhöht ist: 1A50, 3A29, T4, T5, T8 und T10  
(entspricht SEQ ID Nr. 3, 4, 5, 6, 7 und 8). In Abb. 1 sind  
25       die cDNA Sequenzabschnitte der erwähnten Fragmente  
dargestellt.

Von den hier dargestellten Sequenzabschnitten wurden  
weiterhin erfindungsgemäß Oligonukleotidsequenzen für die  
Durchführung einer Real Time RT-PCR abgeleitet. Mit Hilfe  
30       dieser Oligonukleotidsequenzen ist eine relative  
Quantifizierung der Expression der korrespondierenden  
mRNA's in Bezug zum „house keeping gene“  $\beta$ -actin in  
Rattenzellen möglich. Ebenso wurden anhand der homologen

5        Mausequenzen    Oligonukleotidsequenzen    zur    relativen  
Quantifizierung der korrespondierenden mRNA's in Bezug zum  
„house keeping gene HPRT“ in Mausezellen etabliert.

Mit Hilfe der so etablierten Oligonukleotidsequenzen wurden  
im Rahmen der Erfindung kinetische Expressionsstudien in  
10        mehreren Transplantationsmodellen durchgeführt. Neben dem  
bereits erwähnten Nierentransplantationsmodell in der Ratte  
wurde die Expression der Fragmente auch in einem  
Herztransplantationsmodell in der Maus analysiert. In  
diesem Modell wird den Empfängertieren (CBA) 4 Wochen vor  
15        der Transplantation eine donor-spezifisch Bluttransfusion  
(B10) in Kombination mit dem anti-CD4 Antikörper YTS177  
verabreicht. Das führt zur Induktion einer donor-  
spezifischen Toleranz zum Zeitpunkt der Transplantation.  
Kontrollherzen in unbehandelten Empfängertieren werden  
20        zwischen Tag 7 und Tag 8 abgestoßen.

In Abb. 2 sind die Ergebnisse der Expressionsanalyse für  
die Fragmente 1A50, 3A29, T4, T5, T8 und T10 im  
Nierentransplantationsmodell dargestellt. Abgebildet ist  
die mRNA Expression der Fragmente im Transplantat für  
25        Kontroll-Antikörper behandelte Empfängertiere (Co) am Tag 0  
(naive Nieren), 2 und 5 nach der Transplantation, außerdem  
ist die Expression für RIB5/2-behandelte  
toleranzentwickelnde Empfängertiere (RIB5/2) am Tag 0, 2,  
5, 10, 14 und 300 nach der Transplantation dargestellt.  
30        Alle cDNA Fragmente werden in permanent akzeptierten  
Transplantaten stark exprimiert, hingegen nimmt ihre  
Expression in Transplantaten Kontroll-Antikörper

5 behandelter Empfängertiere zum Zeitpunkt der Rejektion drastisch ab.

Anschließend wurde die Expression der korrespondierenden mRNA's im Herztransplantationsmodell untersucht. In Abb. 3 ist die Expression der Fragmente 1A50 und T8 im  
10 transplantierten Organ dargestellt. Analysiert wurde die mRNA Expression in Transplantaten vorbehandelter toleranzentwickelnder Empfängertiere (DST+YTS177) am Tag 0 (naive Herzen), 2, 5, 7, 8, 10, 40 und 100 nach Transplantation. Verglichen wurden die Ergebnisse mit der  
15 mRNA Expression im Transplantat unbehandelter Kontrolltiere (Co) am Tag 0 (naive Herzen), 2, 5, 7 und 8. Auch im Herztransplantationsmodell weisen permanent akzeptierte Transplantate eine hohe mRNA Expression an 1A50 und T8 auf. In Transplantaten rejizierender Empfängertiere ist die  
20 Expression wiederum stark vermindert.

Die unterschiedliche Expression an 1A50 und T8 widerspiegelt sich auch im peripheren Blut. Nur in Blutzellen von unbehandelten Empfängertieren (Co) kommt es kurz vor der Rejektion (Tag 5) zum Abfall der Expression  
25 von 1A50 und T8 (Abb. 4).

Weiterhin wurde die Expression der cDNA Fragmente 2A5 und 2A15 im Nierentransplantationsmodell (Abb. 5) und im Herztransplantationsmodell (Abb. 6) untersucht. Dargestellt ist jeweils die Expression dieser cDNA Fragmente im  
30 Transplantat rejizierender Empfängertiere. In beiden Modellen kommt es zur Hochregulation der mRNA Expression kurz vor der Rejektion.

5 Mit Hilfe der Identifizierung und Quantifizierung von  
solchen Genmarkern, deren Expression im Transplantat, in  
Flüssigkeiten aus dem Transplantat (Urin, Lavage) oder  
peripherem Blut entweder mit einer lang anhaltenden guten  
Transplantatfunktion oder dem Auftreten von Rejektionen  
10 korreliert, wäre eine Beurteilung der toleranzinduzierenden  
Therapie besser möglich.

Die Expression von 2A5 und 2A15 kann in der Biopsie zur  
Beurteilung von akuten subklinischen Rejektionskrisen und  
beginnender chronischer Rejektionen verwendet werden. Dabei  
15 wäre eine starke, lang anhaltende Expression mit einer  
Rejektion des Organs assoziiert. Dies ist nur bedingt  
abhängig vom Ausmaß der Infiltration mononukleärer Zellen  
in das Transplantat, da in anti-CD4 behandelten  
toleranzentwickelnden Empfängertieren im Nierentransplan-  
tationsmodell die Infiltration der mononukleären Zellen nur  
20 zu 50% reduziert ist. Dies würde die Auswertung einer  
Biopsie erheblich verbessern, da nicht nur die Infiltration  
in das Organ als Kriterium für eine akute Abstoßung  
herangezogen wird, sondern auch qualitative Veränderungen  
25 der infiltrierenden Zellen. Die Expression von T4, T5, T10,  
3A29, T8 und 1A50 in der Biopsie kann z.B. zur Beurteilung  
des Therapieerfolges herangezogen werden. Dies würde eine  
Entscheidung über die sichere Beendigung der  
toleranzinduzierenden Therapie ermöglichen.

30 Der starke Expressionsabfall von 1A50 und T8 in der  
Peripherie in rejizierenden Empfängertieren mehr als 2 Tage  
vor klinischer Manifestation der Rejektion ermöglicht eine  
non-invasive Diagnostik im Blut des Patienten bevor eine

5 Organverschlechterung (z.B. Anstieg des Serumkreatinins)  
nachweisbar ist.

Die Expression von 2A5 und 2A15 in der Biopsie kann zur  
Beurteilung von akuten klinischen und subklinischen  
Rejektionskrisen und beginnender chronischer Rejektionen  
10 verwendet werden. Dabei ist eine starke lang anhaltende  
Expression mit einer immunologischen Rejektion des Organs  
assoziiert. Dies ist nur bedingt abhängig vom Ausmaß der  
Infiltration mononukleärer Zellen in das Transplantat, da  
in anti-CD4 behandelten toleranzentwickelnden  
15 Empfängertieren im Nierentransplantationsmodell die  
Infiltration der mononukleären Zellen nur zu 50% reduziert  
ist. Dies verbessert die Auswertung einer Biopsie  
erheblich, da nicht nur die Infiltration in das Organ als  
Kriterium für eine akute Abstoßung herangezogen wird,  
20 sondern auch die qualitative Veränderung der  
infiltrierenden Zellen. Die Expression von T4, T5, T10,  
3A29, T8 und 1A50 in der Biopsie wird zur Beurteilung des  
Therapieerfolges herangezogen. Dies ermöglicht eine  
Entscheidung über die sichere Beendigung der  
25 toleranzinduzierenden Therapie. Der starke  
Expressionsabfall von 1A50 und T8 in der Peripherie in  
rejizierenden Empfängertieren mehr als 2 Tage vor der  
Rejektion ermöglicht eine non-invasive Diagnostik im Blut  
oder anderen Körperflüssigkeiten, wie in dem Urin, der  
30 Patienten bevor eine Organverschlechterung, wie der Anstieg  
des Serumkreatinins, nachgewiesen werden kann. Somit ist  
folgendes Diagnostikmodell nach der Transplantation  
erfolgreich:



- 5     1. Nachweis von 1A50 und T8 im Blut oder anderen  
Körperflüssigkeiten (z.B. Urin) des Patienten täglich  
kurz nach der Operation und wöchentlich/monatlich im  
weiteren Verlauf, um eine Rejektionskrise und damit  
Fehlschlagen der Therapie vorherzusagen bzw. bei  
10     Absetzversuchen eine Untersuppression zu detektieren,  
bevor eine Organverschlechterung nachweisbar ist.
2. Nachweis von 2A5 und 2A15 in Kontrollbiopsien oder  
transplantatrelevanten Körperflüssigkeiten (z.B. Urin  
bei Nierentransplantation), um ebenfalls  
15     Rejektionskrisen bzw. eine Untersuppression  
rechtzeitig zu detektieren und die Gefahr der  
Entwicklung einer chronischen Abstoßung vorherzusagen.
3. Nachweis von T4, T5, T8, T10, 1A50 und 3A29 in  
Kontrollbiopsien oder transplantatrelevanten  
20     Körperflüssigkeiten, um den Erfolg der  
toleranzinduzierenden oder konventionellen Therapie  
einzuschätzen, insbesondere, um das gefahrlose  
Absetzen/Reduzieren der Therapie zu ermöglichen.

25     Beispiel 2

In einem weiteren Tiermodell für Toleranz wurden Biopsien  
von Mäusen untersucht, die spontan, d.h. ohne medikamentöse  
Beeinflussung allogene Lebern akzeptieren  
(Lebertransplantate von B10 Mäusen auf CBA Empfängermäuse),  
30     d.h. eine spontane Toleranz entwickeln - ein Phänomen, dass  
auch nach allogener Lebertransplantation nach einigen  
Jahren auftreten kann. Am Tag 0, 1, 2, 5, 7, 8, 10, 40, 100 nach

- 5 Transplantation wurden in den Transplantaten dieselben  
Marker wie zuvor nach Nieren- bzw. Herztransplantation  
untersucht. Abb. 7 fasst die Ergebnisse vergleichend  
zusammen. Die Spontantoleranz mit transienter  
selbstlimitierender Abstoßungskrise in diesem Modell  
10 spiegelt sich in einer stabil hohen Expression der  
Toleranz-Marker T8 und 1A50 über den gesamten  
Beobachtungszeitraum sowie einem nur temporären Anstieg der  
Rejektionsmarker 1A6, 2A5, 2A15 in der ersten Woche nach  
Transplantation wider.
- 15 Dies unterstreicht in einem weiteren experimentellen Modell  
die klare Assoziation der Expression der genannten Marker  
mit Toleranz bzw. Rejektion.

### Beispiel 3

- 20 Im beschriebenen Maus-Herztransplantationsmodell konnte  
gezeigt werden, dass ein Großteil der Herzen nach  
Toleranzinduktion mit beschriebenen Protokoll langfristig  
überlebt, dass jedoch einige Herzen Zeichen einer  
chronischen Rejektion entwickeln, die mit einer  
25 Funktionseinschränkung einhergehen. Diese kann durch den  
"Herzpalpationscore" (palpatorische Bestimmung der Stärke  
und des Rhythmus (des Herzschlages) bestimmt werden, wobei  
ein hoher Score (>3) eine gute Herzfunktion bedeutet. Im  
Doppelblindansatz wurden Herzpalpationsscore und Expression  
30 der Toleranzmarker T8 und 1A50 vergleichend bestimmt und  
gegeneinander korreliert (Abb. 8). Es ergab sich eine klare  
Korrelation zwischen der Herzfunktionsfähigkeit und der

5 Expression von T8 ( $r=0,785$ ) bzw. 1A50 ( $r=0,784$ ). Dies bedeutet, dass die beiden Toleranzmarker sich sehr gut für die Voraussage einer inkompletten Toleranz, die zwar eine akute Rejektion nicht aber die Entwicklung einer chronischen Rejektion verhindert, eignen.

10

#### Beispiel 4

Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass für die Aufrechterhaltung einer stabilen peripheren Toleranz die Bildung von spezifischen regulatorischen CD4+ T-Zellen  
15 notwendig ist, die offenbar im toleranten Transplantat akkumulieren und dort die Aktivierung und Wirkung von Effektor-T-Zellen hemmen. Wie publiziert kann man auch in unseren Modellen mit Milzzellen und noch effektiver mit transplantatinfiltrierenden Zellen (TIZ) Toleranz auf naive  
20 Empfängertiere übertragen ("infectious tolerance"). Um zu prüfen, ob die benannten Toleranzmarker T8 und 1A50 in diesen Zellen überexprimiert sind, wurden die TIZ mittels Kollagenaseverdaus aus den Transplantaten isoliert, mittels spezifischer Antikörper sortiert und hinsichtlich ihrer  
25 Genexpression charakterisiert. Die Daten zeigen, dass 1A50 und noch stärker ausgeprägt T8 in TIZ von Transplantaten toleranter Tiere im Vergleich zu denen rejektierender Tiere stark überexprimiert ist und dass diese Expression in sortierten CD4+ TIZ nachweisbar wird (Abb. 9). Dies weist  
30 daraufhin, dass offenbar transplantatinfiltrierende regulatorische T-Zellen diese Toleranzmarker exprimieren.

## 5 Beispiel 5

Es wurden die humanen Homologe der genannten Sequenzen identifiziert. Es wurde nun geprüft, ob die Marker mittels real-time RT-PCR auch in Biopsien und Blutleukozyten von nierentransplantierten Patienten detektierbar sind. 1A50, 2A5, 2A15 waren in allen Biopsien bzw. Blutproben nach Nierentransplantation nachweisbar. Patient 1 entwickelte eine akute Abstoßung am Tag 23 nach Lebendspendetransplantation. Zu diesem Zeitpunkt konnte eine Abnahme des Toleranzmarkers 1A50 und eine Zunahme des Rejektionsmarkers 2A15 in den peripheren Leukozyten beobachtet werden (Abb. 10). Patient 2 zeigte einen komplikationslosen Verlauf und kaum Schwankungen in der Expression dieser Marker.

Weiterhin wurden Biopsien aus den Transplantaten nierentransplanterter Patienten mittels real-time RT-PCR analysiert. Patient 3 und 4 zeigten in Biopsien Zeichen einer subklinischen Rejektion Banff - Grad Ia bzw. Ib. Der Toleranzmarker 1A50 war bei Rejektion relativ niedrig exprimiert (besonders Patient 4) im Vergleich zu Biopsien von Patienten mit stabiler Funktion und ohne Zeichen einer Abstoßung im Transplantat (Patient 5+6) (Tabelle 1). Im Gegensatz dazu, war die Expression des 2A15 Rejektionsmarkers am höchsten in den beiden Proben mit Rejektion (Patient 3+4) und deutlich niedriger bei normaler Funktion (Patient 5+6). 2A5 war ähnlich detektierbar zeigte aber geringere Unterschiede.

5      Damit bestätigen die ersten Patientendaten, dass die Gene  
auch im Humansystem detektierbar sind und dass sich ihre  
Regulation sehr ähnlich zu der in den Tiermodellen verhält.

10      Tabelle 1: Genexpression in Nierenbiopsien transplanterter  
Patienten

Patient Nr.	Transplantatfunktion	Genexpression (Units Ratio zu HPRT)		
		1A50 ( $\times 10^{-1}$ )	2A15( $\times 10^{-1}$ )	2A5( $\times 10^{-1}$ )
15      3	akute Rejektion	3,0	5,2	0,2
4	akute Rejektion	1,8	4,0	0,2
5	stabil normale Funktion	5,5	0,4	0,1
6	stabil normale Funktion	7,9	0,2	0,1
7	Kontrollniere			
20      (kein Transplantat)		4,0	0,2	0,1

5

**Patentansprüche**

1. Isoliertes Nucleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe umfassend:
- 10 a) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1 - 8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen,
- 15 b) ein Nucleinsäuremolekül, welches mit einer Nucleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,
- c) ein Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,
- 20 d) ein Nucleinsäuremolekül, das in Folge des genetischen Codes zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und
- 25 e) ein Nucleinsäuremolekül gemäß einer Nucleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nucleotidsequenz gemäß a) bis d) ist.

- 5        2. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die unter c) angegebene Nucleotidsequenz mindestens 40%  
homolog zu einer der unter a) angegebenen  
Nucleotidsequenz ist.
- 10       3. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die unter c) angegebene Nucleotidsequenz mindestens  
60%, vorzugsweise 70%, bevorzugt 80%, ganz besonders  
15 bevorzugt 90% homolog zu einer der unter a) angegebenen  
Nucleotidsequenz ist.
- 20       4. Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
es eine genomische DNA, eine cDNA und/oder eine RNA  
ist.
- 25       5. Vektor umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem  
der Ansprüche 1 bis 4.
- 30       6. Wirtszelle umfassend den Vektor gemäß Anspruch 5.
7. Polypeptid, kodiert durch ein Nukleinsäuremolekül gemäß  
einem der Ansprüche 1 bis 4.
8. Erkennungsmolekül        gerichtet        gegen        ein  
Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4,

5           einen Vektor gemäß Anspruch 5, eine Wirtszelle gemäß  
          Anspruch 6 und/oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 7.

9.   Erkennungsmolekül nach Anspruch 8,  
     dadurch gekennzeichnet, dass  
10    es ein Antikörper, ein Antikörperfragment und/oder ein  
      Antisense-Konstrukt ist, insbesondere ein RNA-  
      Interferenzmolekül.

10.   Vakzine, umfassend ein Nucleinsäuremolekül gemäß einem  
15    der Ansprüche 1 bis 4, einen Vektor gemäß Anspruch 5,  
      eine Wirtszelle gemäß Anspruch 6 und/oder ein  
      Polypeptid gemäß Anspruch 7 und/oder ein  
      Erkennungsmolekül nach Anspruch 8 oder 9 gegebenenfalls  
      mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.

20

11.   Verfahren zur Detektion von Transplantat-Reaktionen in  
      einer Probe von einem Patienten,  
      dadurch gekennzeichnet, dass  
      in der Probe ein Level von mindestens einem  
25    Nucleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4  
      bestimmt und der Level mit einem Kontroll-Level einer  
      Vergleichsprobe von einem gesunden Patienten verglichen  
      wird, wobei durch einen modifizierten Level in der  
      Probe im Vergleich zu dem Kontroll-Level die  
30    Transplantat-Reaktionen bzw. das Fehlen selbiger  
      (Toleranz) detektiert wird.



- 5 12. Verfahren nach Anspruch 11,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
das Transplantat ausgewählt ist aus der Gruppe  
bestehend aus Lunge, Milz, Herz, Niere, Leber, Pankreas  
allein oder in Kombination und/oder von Geweben,  
10 insbesondere Inseln, Aorten, Knorpel.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
als der Level eine DNA-, eine RNA-Konzentration, eine  
15 Genexpression, eine Kopienanzahl einer Nucleinsäure,  
eine Peptidkonzentration, eine Peptidaktivität und/oder  
eine Konzentration von Isoformen, bestimmt werden.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13,  
20 dadurch gekennzeichnet, dass  
der Level als eine mRNA-Konzentration bestimmt wird.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 14,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
25 als die Transplantatreaktion eine Rejektionskrise, eine  
Abstoßungsreaktion, ein Abstoßungsverlauf, eine  
Toleranzreaktion und/oder ein Toleranzverlauf  
detektiert werden.
- 30 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15,  
dadurch gekennzeichnet, dass

5 durch einen verminderten Level eines Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 3 und SEQ ID Nr. 7 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen die Abstoßungsreaktion, der  
10 Abstoßungsverlauf und/oder die Rejektionskrise detektiert wird.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass  
15 durch einen erhöhten Level eines Nucleinsäuremolekül umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID 1 und Nr. SEQ 2 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen die Abstoßungsreaktion, der Abstoßungsverlauf und/oder die  
20 Rejektionskrise detektiert wird.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass  
durch einen erhöhten Level eines Nucleinsäuremolekül  
25 umfassend eine Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5, SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 7 und SEQ ID Nr. 8 oder deren komplementären Nucleotidsequenzen die Toleranzreaktion oder der Toleranzverlauf detektiert  
30 wird.

19. Verwendung eines Nucleinsäuremoleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, eines Vektor gemäß Anspruch 5, einer

- 5        Wirtszelle gemäß Anspruch 6, eines Polypeptid gemäß  
Anspruch 7, eines Erkennungsmolekül nach Anspruch 8  
oder 9 und/oder einer Vakzine gemäß Anspruch 10 in der  
medizinischen Prophylaxe, klinischer Verlaufskontrolle,  
Transplantat-nachbehandlung, klinischer Diagnostik  
10        und/oder Therapie.
20. Verwendung nach Anspruch 19 zur Detektion von T-Zell-  
vermittelten Immunprozessen, insbesondere pathogenen T-  
Zell-vermittelten Immunprozessen.
- 15        21. Verwendung nach Anspruch 19 oder 20,  
dadurch gekennzeichnet dass  
die T-Zell-vermittelten Immunprozesse Autoimmun-  
erkrankungen oder Entzündungen sind, insbesondere eine  
20        antiglomeruläre Basalmembrankrankheit, Autoimmun-  
krankheiten des Nervensystems, ein systemischer Lupus  
erythematoses, eine Addison-Krankheit, ein  
Antiphospholipid-Syndrom, eine IgA-Glomerulonephritis,  
ein Goodpasture-Syndrom, ein Lambert-Eaton-Myasthenie-  
25        Syndrom, ein bullöses Pemphigoid, eine  
thrombozytopenische, idiopathische Purpura, eine  
Autoimmun-Thyreoiditis, eine rheumatoide Arthritis, ein  
insulinabhängiger Diabetes mellitus, ein Pemphigus,  
eine autoimmunhämolytische Anämie, ein Dermatitis  
30        herpetiformis Duhring, eine membranöse  
Glomerulonephritis, eine Graves-Krankheit, eine  
sympathische Ophthalmie, Autoimmun-Polyendo-

5       krinopathien, multiple Sklerose und/oder Reiter-  
Krankheit.

22. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 21,  
dadurch gekennzeichnet dass  
10       die T-Zell-vermittelten Immunprozesse physiologische,  
pathologische, klinische und/oder subklinische  
Transplantat-Reaktionen sind.

23. Verwendung nach Anspruch 22,  
15       dadurch gekennzeichnet, dass  
die Transplantat-Reaktionen eine Rejektionskrise, eine  
Abstoßungsreaktion, ein Abstoßungsverlauf, eine  
Toleranzreaktion und/oder ein Toleranzverlauf.

20       24. Kit umfassend ein Nucleinsäuremolekül gemäß einem der  
Ansprüche 1 bis 4, einen Vektor gemäß Anspruch 5, eine  
Wirtszelle gemäß Anspruch 6, ein Polypeptid gemäß  
Anspruch 7, ein Erkennungsmolekül nach Anspruch 8 oder  
9 und/oder eine Vakzine gemäß Anspruch 10.

25       25. Verwendung des Kits nach Anspruch 24 zur Detektion  
einer Transplantatreaktion.

---

SEQ ID Nr.: 1

---

Seq ID: 2A5

ACTTTCTCTA TAGCTCCTGG TAAGTAAATT TCTTTCTCCA ATACTTTTGT 50  
AGTTAAATGT TTTAGTTTAT GTGGGGGTTT AGTTATGTTG GTTGGTTGTA 100  
G 101

---

---

SEQ ID Nr.: 2

---

Seq ID: 2A15

ATTTTAAAA AGCAGCCGGG GCCTGGGGTT TCTACCCGTG TACCAGGGGC 50  
CCTCTGGCCC AGAGCTGACC AAATCTGGCT CCATGGAGCA CACAGAGGCT 100  
TTGATCAGGG ACAGTAATCC TCTGCAACAT CAGGAATGGC TGAATGCACA 150  
GGATTACCA AGCCTCAGCC AAAGCATCCC GTGGCCTGAT GTCTCGGAGC 200  
AACCCTGTCC ACACGAGGAA AGGTCAGGCC TGCTCAACAT GACCAAGATT 250  
GCTCAAGGAG GGCACAACT CAGGAAGAGC CGGGGCCCTG CTTGGGTAG 299

---

Abb. 1A

SEQ ID Nr. 3

## Seq ID: 1A50

GACTTTATTC ACAATAGAGA AATTTTACAA ATATAATTTT TAAAAATTAT 50  
GTGTCAATCT ATTATGTTTT CCGTAACATC AGAGATTTAT ATAAAGTTGG 100  
AAACAACAGA ATGCACTTAT GAACAAATCA AAAACAATGT TTAAATTGGA 150  
TGGATACACA CGACAGAGAA GTCCTGAGT TCTCTAAATG AGCACACAAC 200  
TTATAGGTGT ATATTAAGT CACAAAGTAT CCAAACATG TTTGTAACAC 250  
AAAATCGGGT GCTACTTTAA CTGCTCACCT TTAAGGGCGT GGATCATACA 300  
TGTAAGTCAA ATTGCACAGC TTTGTTGGAA ATGAATGACT CGTCATCTAT 350  
TTGGAGACTT CCGTTGCTTA AAATTGACAC AAAAGCCTAA TCAATTACGC 400  
TACTATAAAA TTTGTCTCTT ATCTCGTTA AATTTTGGT GTTCTGTGAT 450  
CTGGCATTAA AAAACAGTCC AAGTTTTAAA ACAGAAAACA TTGCTCGCCA 500  
GTTGGAGAGT AGCTCGTGGT TCGGCTTCT CCCTGCTCGA ACCGGAACAA 550  
ACGCTACAGT 560

SEQ ID Nr. 4

## Seq ID: 3A29

ACATTCATTA TTAAATGTGA TAATAGAGGT AGAGGTATAA ATAATATGAA 50  
GGGGTGAGGG AACCAGTTCT ACCCGGTTTG TTTTGAATGC TTAAATTATG 100  
TAATTTAAAT AGATAATCTT TACTTATGTA GGTCTTTTGG AAATAACTTT 150  
ATAAATTTAA CACAGAGGAC TACTACTAAA CGTGAGAGGT ATGATAATCG 200  
GCATGGAAGT TGGGCTGGTT GACCACCAA GTTCAATTCT TAAAGACATC 250  
TTAATCCTGA ATATAAAAAT GCCTTTGTGG GTTTAGAATT AGAATTTAAT 300  
TTTGGCATT 310

SEQ ID Nr. 5

## Seq ID: T4

ACTGCATGAT GGGTTTTATT GAGACCAGGG GACAGTGTGA CACTCAGGGG 50  
TTTTCTTCA TAACTTCTTT TATCCAGGAG GTGAACCTAA TAAGTTTGGT 100  
GTAGATGGCT GGCATGTTGG TTTTGCGCA TGATAG 136

SEQ ID Nr. 6

## Seq ID: T5

CTATCATGCG TGTAAGTCTTG GTGCCCTGGC CGAGTTAGAA GCCAGCTGAG 50  
ATAGCTTGCA GCATCTCTTC TAGTTTGAGT GATGATGTAA TGAGGAAAAT 100  
CTAGTAGGTA GAAAGAGTTC AGGAAGAAGG AAACCCTCCT CTGCCTTTGA 150  
AAAGAGGCTC TGCAGGAGCA TCACGCCCTT CACAGAGAAG AGTGTAGACT 200  
GGCTTTCCAC TAGTGTTGAA CCTACACTCT TCGGTGGGTT AACAGTCATG 250  
TGCTCGCCAT CAGAGCCTTT TTGCATGCAG TGGTGGGCTC TCCCGGTTTA 300  
TCCCACCTCC CACAGGTGAT TAAACCACAG CCCTGTAAAA AAAAAA 347

SEQ ID Nr. 7

## Seq ID: T8

TTACCCACAG TGCATTATAA CAAAGGAGAT GCTAAAGTCA GTTTTTCATG 50  
TTTGTGGTTT TTCTGAAACA TCATTCATT AAACAATTCA AATATATGTT 100  
CAAAATAAGA AGTGGTTTAT AAAAGGATTG TGTGTGCCAT GTGGCTTTTG 150  
ACCCGTGCTA TTATAAATGT TGCCATAAAT ACTCTCTATA AGAAACAGTC 200  
CTTAAGTAGA TTTGGTGGCA CACATCTTTA ATCCCAGCAC TTGGGAAGCA 250  
GAGACAGGTG GATCTCTGTG AGTTTAAGAC CAACCTGGTC TATAAAGTGA 300  
GTTCCAGGAC AGCCAGGGTT GTTAAACATA GAGAACTCT GGGGCGATGG 350  
GGAGGGGTCT CGTCAAACAT GAAATTTATT AGAAAATTGG TCGGATTAAG 400  
CTATGTCTAG TATCAACTAA TATGGAATCT TGTATAATCT GTGTTACATT 450  
GGATTTGTCT CAGAACTAAT TGTTTCATAA TAACTATGC CTTGGCCACC 500  
ACGAAAAAAA AAA 513

SEQ ID Nr. 8

## Seq ID: T10

AGGCTAGGGC TAGTTCTGCG GACCCTCTCG GAGAGAGGAA TAAGGTTGAA 50  
CTGCCTGTCC GGTTCTCCTT CCCCTATTCC CAGATGCAGG TGGAAGCCTC 100  
CCTCTAGTCC TTCCCCCTAA CCGCGACGAA GACCTTGGCT AACACTTGCT 150  
CCTTTCGCAC ACCATAGAAA ATGCAGTGCA GACAAACACA GCCTCGTCAG 200  
GCGCTTGAGG AGCGAAGTCC AATCTGGGTC GGCACCTGCA CCAGGTCTTT 250  
GCGCACCTGG TCAGAAGACC GGCACCCAAT AGTTGCTTAT TAACTCTAC 300  
GTTTGTCCCG AAA 313

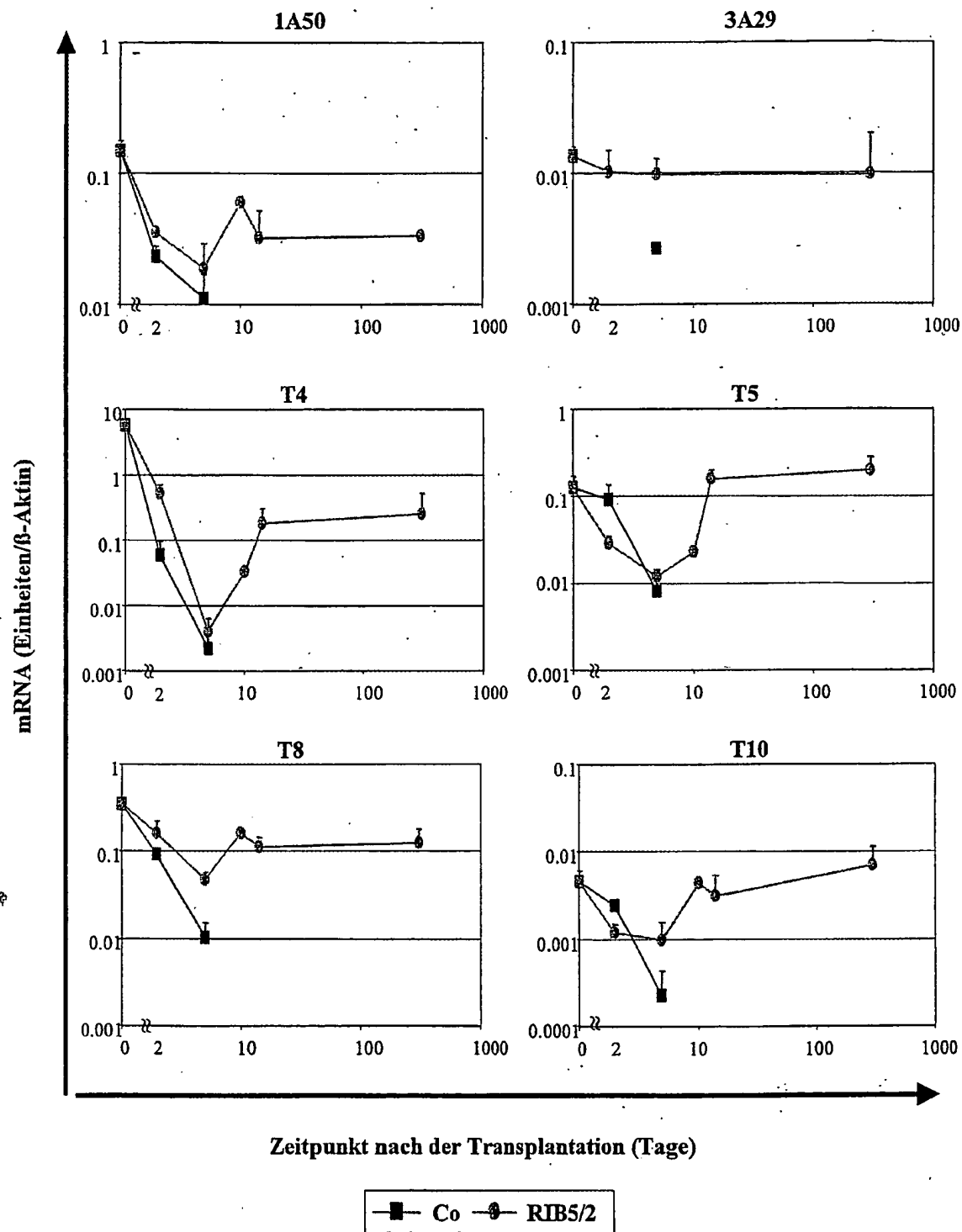


Abb. 2



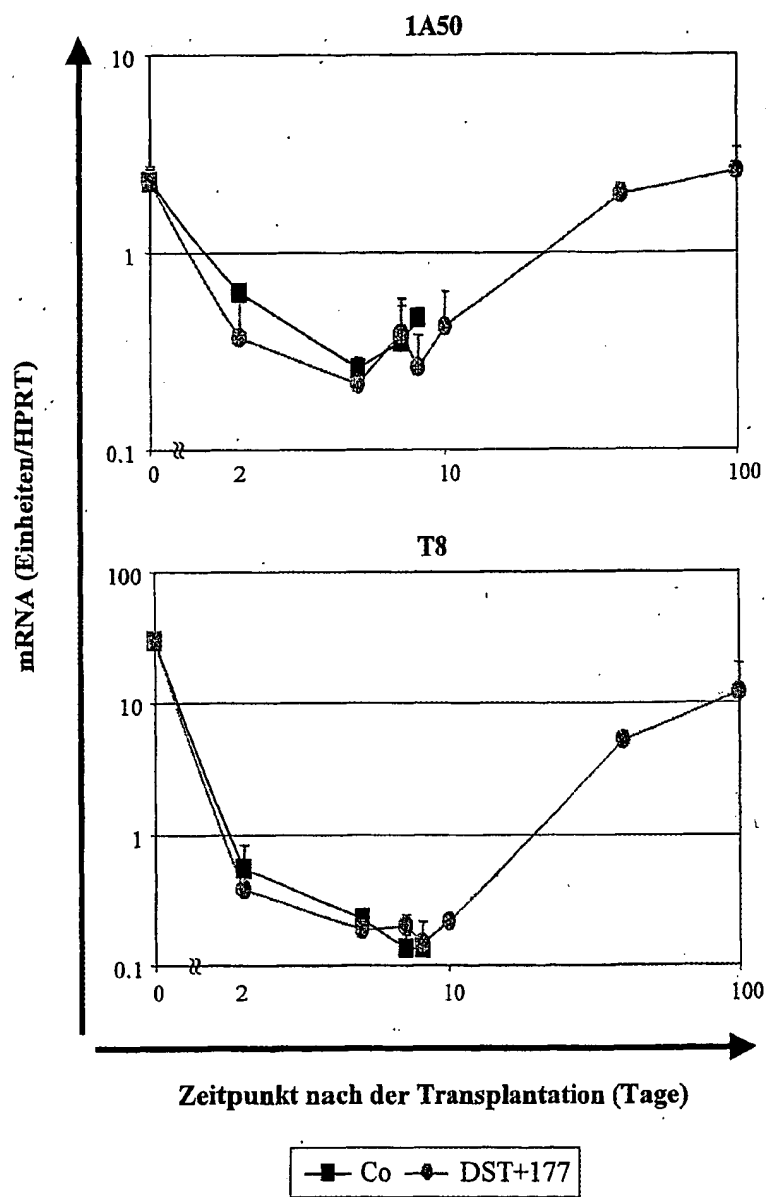


Abb. 3

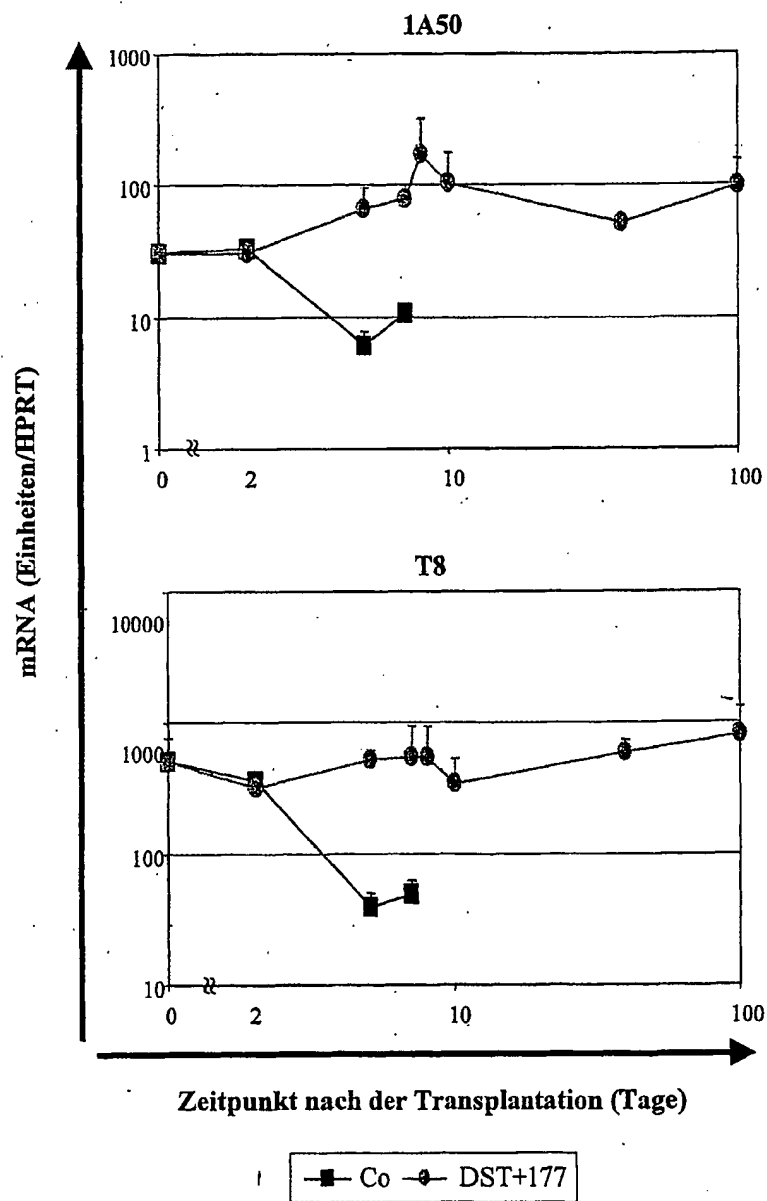


Abb. 4

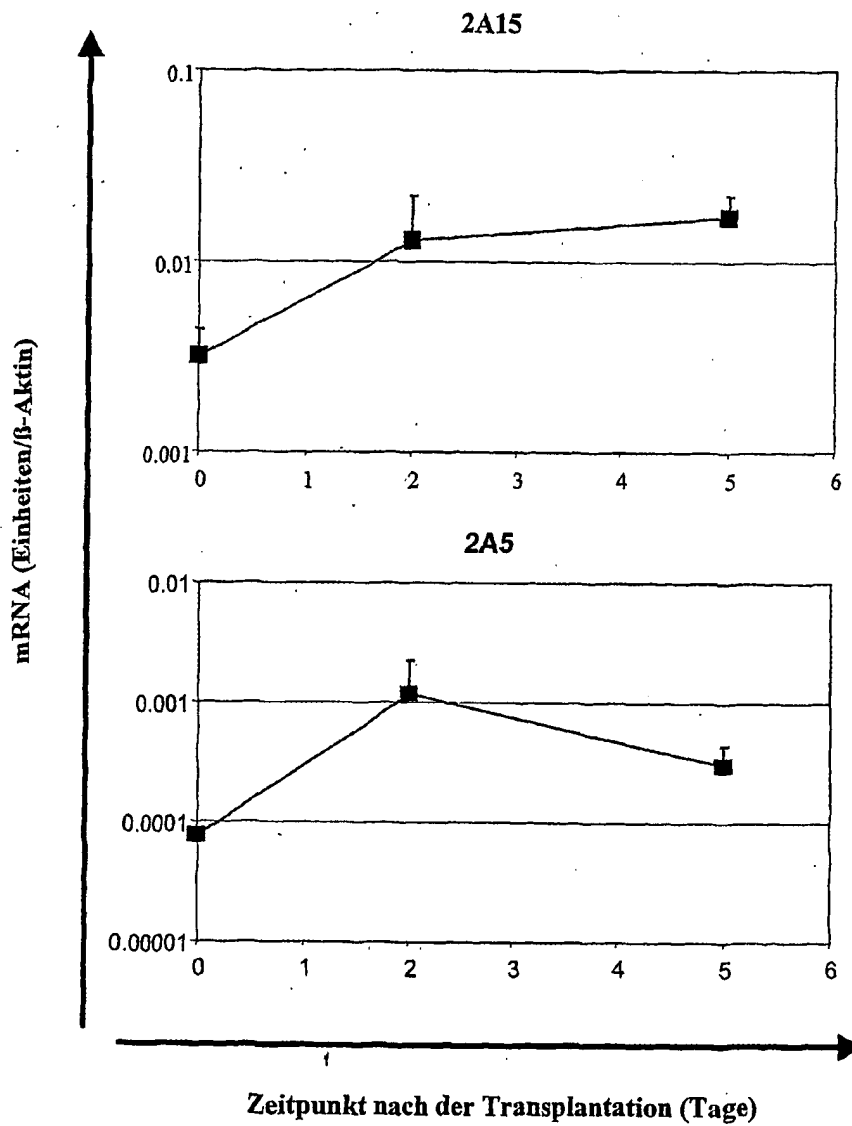


Abb. 5

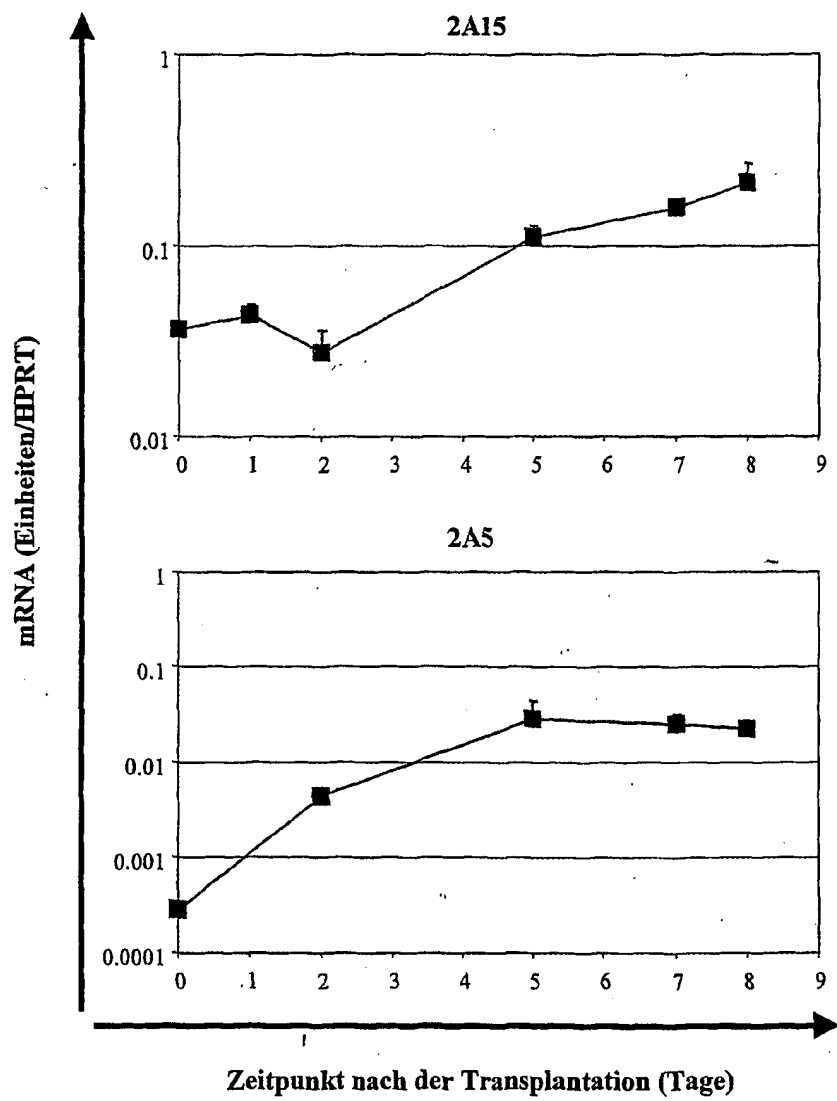


Abb. 6

Abb. 7

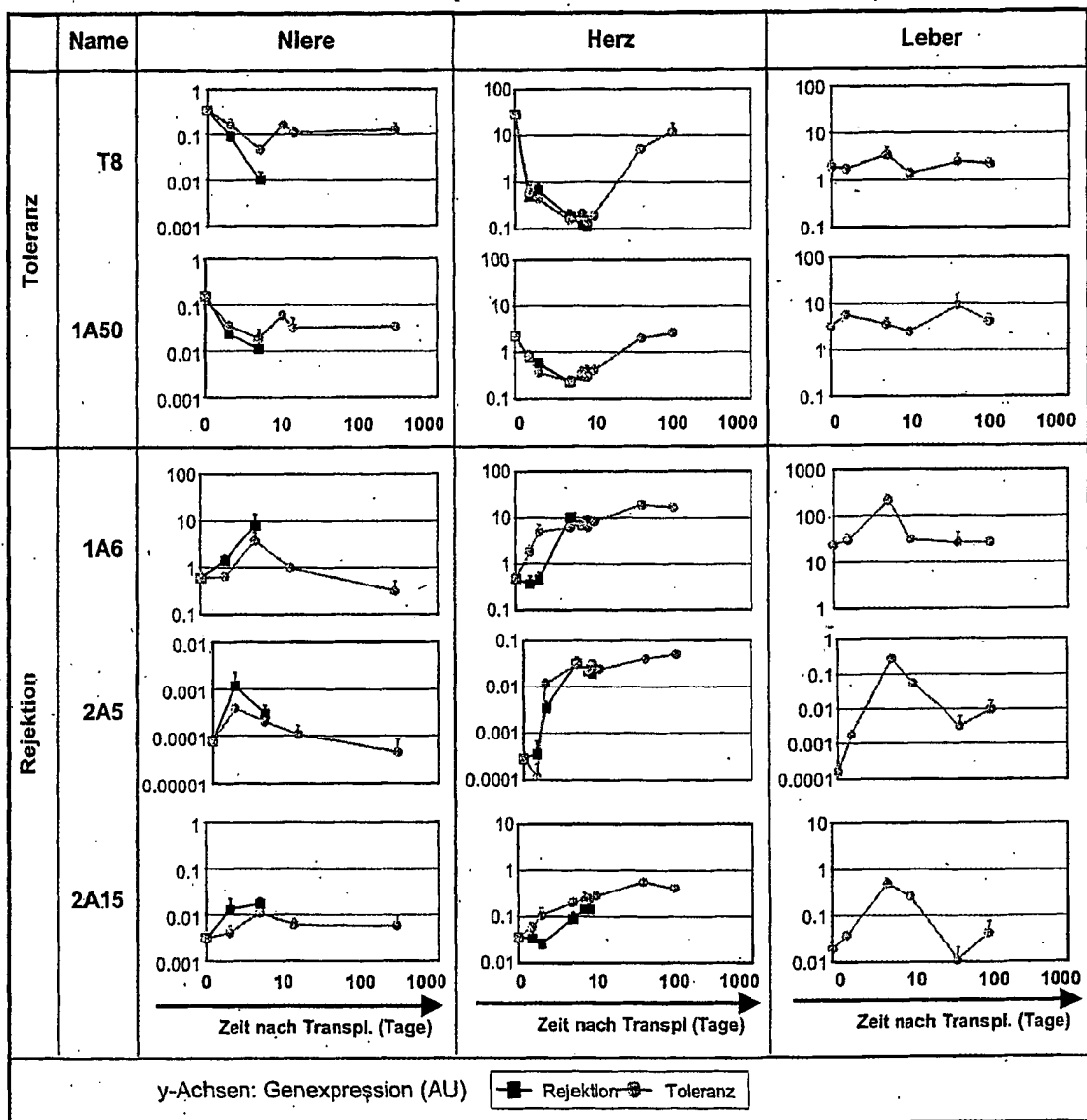


Abb. 8

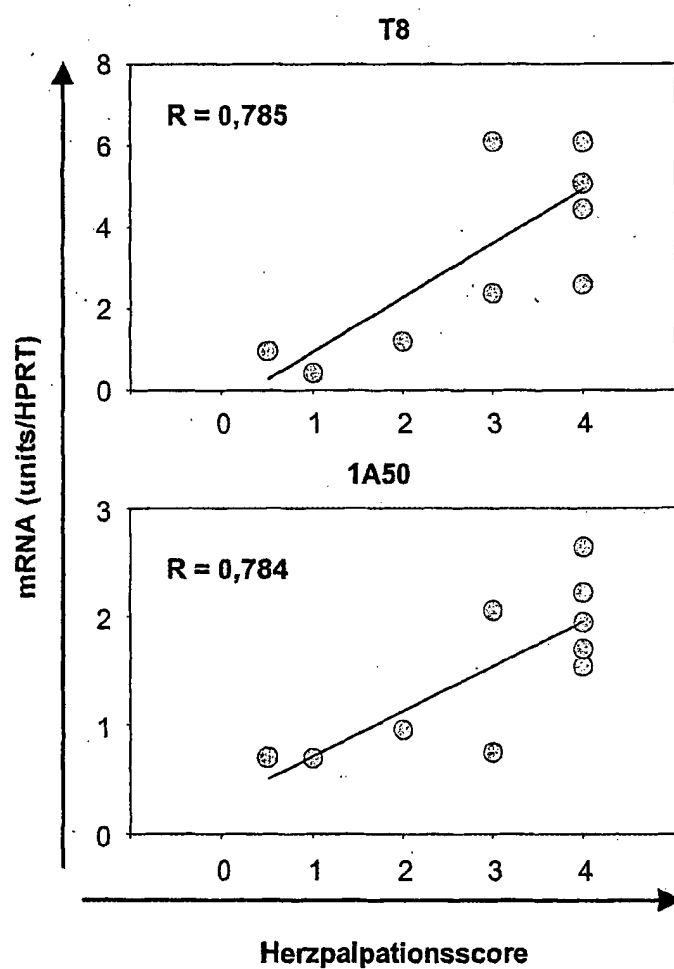


Abb. 9

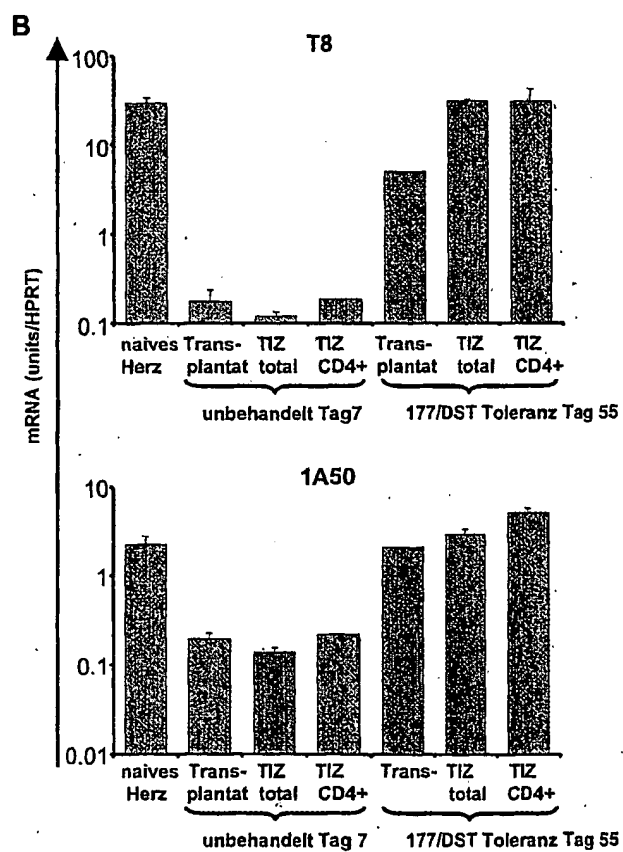
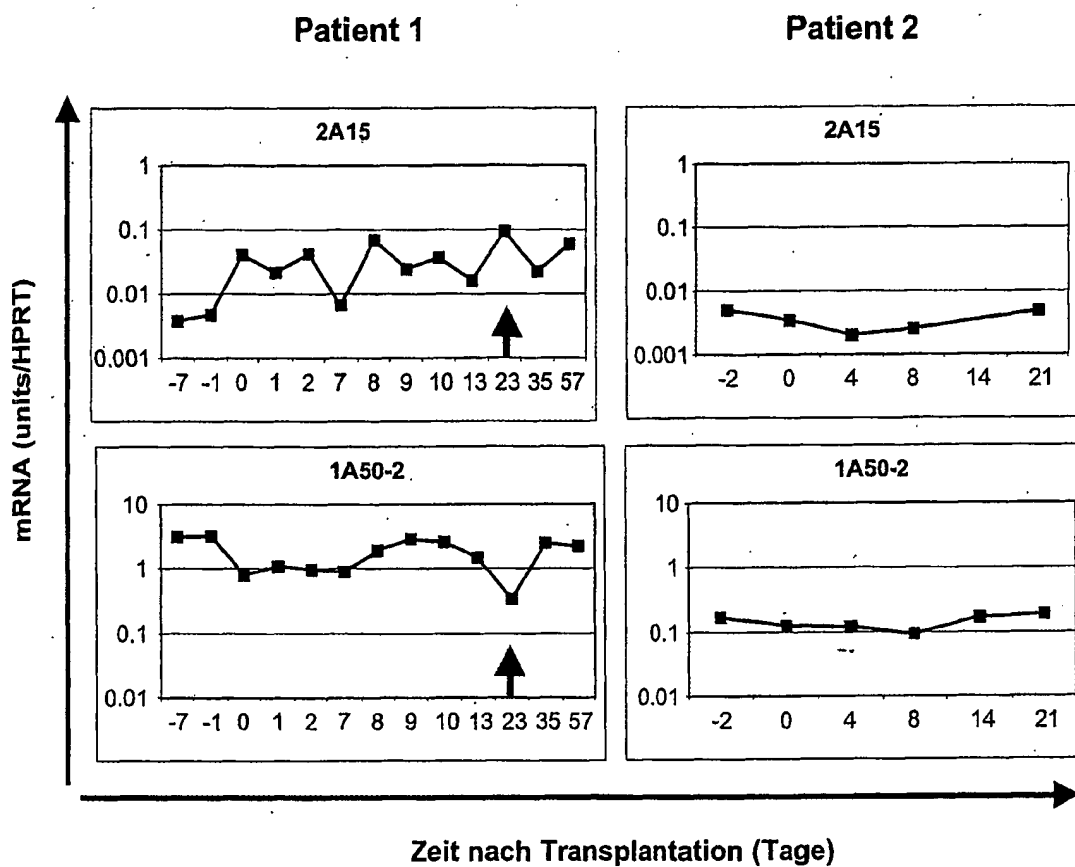


Abb. 10



↑ Biopsie-abgesicherte Diagnose einer akuten zellulären Rejektion